



**Rapport de mission à Ilhéus - Brésil  
Visite à l'UESC et au centre CEPLAC/CEPEC**

**29 novembre au 7 décembre 2003**

-----

Philippe Petithuguenin  
Programme Cacao  
CIRAD-CP

CP N° 1689



## Résumé

Cette mission avait deux objectifs principaux :

- Evaluer la situation de F. Micheli, génomicienne du CIRAD/Programme Cacao dans le dispositif du laboratoire de biotechnologie de l' UESC (Université d'Etat de Santa Cruz, Ilhéus, Etat de Bahia), un an environ après son affectation dans cette équipe (octobre 2002),
- Identifier les modalités pratiques et les objectifs scientifiques d'une affectation en 2004 de D. Clement auprès du centre de recherche publique sur le cacao de la CEPLAC/CEPEC.

Les objectifs fixés pour cette mission ont été atteints. La mission a pu vérifier la bonne insertion personnelle et professionnelle de F. Micheli à l'UESC, et évaluer ses perspectives de recherche pour l'année 2004. Des actions ont été proposées pour renforcer le partenariat entre le programme Cacao du CIRAD et l'UESC, et pour faciliter le rapprochement entre les activités de F. Micheli à l'UESC au Brésil et celles des laboratoires du CIRAD à Montpellier.

Concernant le partenariat CIRAD / CEPEC, les modalités d'affectation de D. Clement au CEPEC fin 2004 ont été définies et la rédaction d'un accord cadre de partenariat a été engagée. La nécessité d'obtenir un financement complémentaire pour pérenniser cette affectation a été soulignée et des pistes possibles identifiées. Cette affectation devrait donc pouvoir être réalisée fin 2004, et différentes activités préparatoires à ce départ ont été décidées.

Les contacts établis avec le directeur et les chercheurs de la ferme expérimentale Almirante Cacao (appartenant à la société Mars/Masterfoods) permettent d'envisager un renforcement de notre collaboration avec cette institution. A court terme, ce renforcement pourrait prendre la forme de l'accueil par Almirante d'étudiants sélectionnés et co-encadrés par des chercheurs du Cirad.

Concernant les recherches sur Hévéa, 4 possibilités de collaboration avec le Cirad ont été identifiées. Elles impliqueraient Michelin, l'UESC et le CEPEC, et couvrent différents sujets dont l'étude de l'association culturelle Hévéa-Cacao.

## **Agenda de la mission**

*Samedi 29 novembre 2003 :*

Montpellier - Paris - Sao Paulo – Salvador - Ilhéus

*Dimanche 30 novembre 2003*

Arrivée à Ilhéus à 12h15

Rencontre avec D Clement (CIRAD) et Uilson Lopez (Cepec)

*Lundi 1 décembre 2003 :*

Visite Almirante Cacao (ferme expérimentale appartenant à Masterfoods)  
(M Aitkens, R Machado, A Pomella)

*Mardi 2 décembre 2003 :*

UESC

(J Cascardo, D Anherdt, F Micheli)

*Mercredi 3 décembre 2003 :*

CEPLAC/CEPEC

(Uilson Lopez, K Gramacho)

*Jeudi 4 décembre 2003 :*

Visite Plantation Michelin Bahia

(C Mattos, Lionel Barret)

Soir : Réunion organisée par Masterfoods (J Lundee, P Hebbar, H Shapiro) pour la Banque Mondiale (J Toledano et J Bond) sur la recherche cacaoyère au Brésil (Cepec, Uesc, Almirante Cacao, CIRAD)

*Vendredi 5 décembre 2003 :*

CEPEC

(Uilson Lopez)

UESC

(F Micheli, D Anherdt)

*Samedi 6 décembre 2003 :*

Départ de Ilhéus pour Montpellier, via Salvador, Sao Paulo et Paris

*Dimanche 7 décembre 2003*

Arrivée Montpellier 20h05

## **1. Contexte**

### ***Objectifs de la mission :***

Cette mission avait deux objectifs principaux :

- Evaluer l'insertion de F. Micheli, génomicienne du Cirad/Programme Cacao dans le dispositif du laboratoire de biotechnologie de l' UESC (Université d'Etat de Santa Cruz, Ilhéus, Etat de Bahia), un an environ après son affectation dans cette équipe (octobre 2002),
- Identifier les modalités pratiques et les objectifs scientifiques d'une affectation en 2004 de D. Clement auprès du centre de recherche publique sur le cacao de la CEPLAC/CEPEC (situé entre Ilhéus et Itabuna).

Deux objectifs secondaires ont pu aussi être assignés à cette mission : maintenir le contact scientifique avec l'équipe de la ferme expérimentale Almira cacao de la compagnie Masterfoods et se renseigner sur les opportunités de conduire des recherches au Brésil sur les associations culturales Cacaoyer - Hévéa.

### ***Déroulement :***

Pour l'organisation de cette mission et l'appui logistique sur place, le missionnaire adresse ses remerciements à F. Micheli, chercheur du Cirad/PrCC en poste à Ilhéus, et à D. Clement, chercheur du Cirad/PrCC qui se trouvait sur place en mission depuis la mi novembre 2003.

Cette mission scientifique et partenariale a bénéficié de l'appui financier du Ministère Français des Affaires Etrangères, via la délégation Cirad/Inra à Brasilia. Le missionnaire adresse ses remerciements au MAE et au Directeur Régional du Cirad, E. Hainzelin, pour cet appui.

Concernant le déroulement de cette mission, il faut noter que, par coïncidence, la mission a rencontré à Ilhéus deux responsables de la Banque Mondiale (J. Bond et J. Toledano) qui étaient invités par la société Mars/Masterfoods pour mieux connaître les actions de recherche en cacaoculture conduites au Brésil. Cette action de lobbying de Mars/Masterfoods a pour but de mobiliser l'appui de la Banque Mondiale pour des projets de recherche et de développement en cacaoculture, notamment en Afrique de l'Ouest (projet STCP).

## **2. Collaboration avec l'UESC**

Un accord de collaboration entre le Cirad (département des cultures pérennes, programme Cacao) et l'Université d'Etat de Santa Cruz (UESC) à Ilhéus (Bahia) a été signé en juillet 2002 pour une période de 3 ans. Cet accord prévoit la mise à disposition à l'UESC d'un chercheur du Cirad spécialisé en génomique. C'est dans ce cadre que F. Micheli a été affectée au Brésil en octobre 2002, pour travailler au sein du laboratoire de biotechnologie de l'UESC.



## 2.1. Situation du Laboratoire de «Génomique et Expression génétique» de l'UESC.

Le Laboratoire de «Génomique et Expression génétique» du département de Biologie de l'UESC est dirigé par Julio Cascardo. Les activités de ce laboratoire sont en forte expansion depuis quelques années, aussi bien en terme de personnel enseignant/chercheurs, que d'étudiants, de surface de laboratoire ou d'acquisition de matériel de pointe. Ce sont les financements publics brésiliens, via les appels d'offre (CNPq) et divers consortia au niveau fédéral, qui sont à l'origine de cette croissance. Avec près de 40 personnes<sup>1</sup> (y compris des étudiants boursiers) travaillant dans ce laboratoire, c'est actuellement la plus grosse équipe de Biologie Moléculaire des divers états du nord du Brésil.

Ce laboratoire travaille en étroite collaboration avec les laboratoires de «Bio-informatique» et de «Cytogénétique et Marquage Moléculaire» de l'UESC, et est aussi bien inséré dans divers réseaux scientifiques au niveau fédéral brésilien, en particulier grâce aux contacts personnels établis par Julio Cascardo. Ceci facilite l'obtention de financements publics, principalement pour des investissements lourds (séquenceur, microscope à fluorescence....). Une bourse<sup>2</sup> du CNPq a aussi été obtenue pour l'accueil d'un bio-informaticien belge. Les moyens de fonctionnement courant sont très liés aux projets sur financement extérieur, ce qui limite la capacité du laboratoire d'entreprendre des recherches exploratoires sur des sujets non financés.

A court terme, le laboratoire compte sur une évolution favorable des modalités d'appel à proposition de la fondation FAPESB (Etat de Bahia), appel qui devrait être relancé en janvier 2004, pour obtenir un appui financier à divers projets de recherche, dont deux projets Cacao impliquant F. Micheli et un projet Hévée impliquant (potentiellement) D. Garcia.

## 2.2. Situation générale de l'université UESC (Discussion avec Dario Anherdt, vice-recteur) :

L'Université d'Etat de Santa Cruz est une université en expansion : augmentation du nombre d'étudiants accueillis, construction de nouveaux laboratoires, de salles de cours, de serres et de pépinières... Elle comporte 10 départements, couvrant les sciences exactes, la santé, les sciences humaines, l'économie et la Biologie. Le département de Biologie compte actuellement 81 professeurs.

Selon D. Anherdt, le changement récent de gouvernement Brésilien n'a pas de conséquence sur les orientations scientifiques des universités publiques brésiliennes comme UESC : les priorités fixées demeurent les biotechnologies et l'énergie.

D. Anherdt est très satisfait de l'insertion professionnelle de F. Micheli dans l'équipe de J. Cascardo et de la collaboration établie avec le Programme Cacao du Cirad. Il est favorable à l'extension de cette collaboration à d'autres Programmes comme par exemple le Programme Hévée, mais aussi à d'autres thématiques comme l'agroforesterie, l'analyse des systèmes agraires, ou la valorisation des produits agricoles tropicaux par leur transformation sur les lieux de production.

<sup>1</sup> Cinq enseignants/chercheurs sont titulaires d'un Doctorat (dont F Micheli), et deux autres en cours de thèse.

<sup>2</sup> Bourse de 1000 à 1500 € par mois, sur 18 mois à 2 ans.

D. Anherdt comprend aussi la logique scientifique et partenariale conduisant le Programme Cacao à négocier un positionnement de D. Clement au CEPEC. Il considère que cette évolution serait plutôt favorable au développement des recherches sur le cacao entre CEPEC, UESC et Cirad.

Il est à noter que l'UESC a établi un partenariat avec une équipe du CNRS et de l'Université de Lyon pour la mise en oeuvre d'un projet d'installation d'un laboratoire de contrôle de la qualité des aliments exportés vers l'UE. (projet de 10 millions d'Euros, financé par le gouvernement français).

### 2.3. Situation de F. Micheli :

Arrivée au Brésil en octobre 2002, F. Micheli a fait preuve de remarquables qualités d'adaptation à ce nouveau contexte scientifique et culturel. Elle a maintenant une très bonne maîtrise de la langue brésilienne qui lui permet facilement d'encadrer des étudiants, de donner des cours et de rédiger des propositions de recherche pour des appels d'offre brésiliens.

Ses principales activités sont :

- la conduite d'un programme de recherche sur l'interaction Cacaoyer – *Crinipellis pernicioso* (avec mise au point d'un nouveau protocole d'extraction d'ARN totaux, construction de Banques d'ADNc, séquençage d'EST...)
- l'encadrement (ou co-encadrement) de 4 étudiants en «Mestrado» (Maîtrise/DEA)
- le montage de projets et la recherche de financements
- la rédaction de publications et de communications
- l'enseignement (activité effectuée plutôt en appui et à la demande de ses collègues brésiliens du laboratoire car F. Micheli est normalement déchargée d'enseignement)

Ses activités de recherche ont progressé initialement très vite mais ont connu ensuite quelques retards dûs aux délais nécessaires pour l'obtention des réactifs mais aussi à une mauvaise qualité des kits utilisés pour la constitution des banques d'ADNc. Ce problème est maintenant résolu (remplacement du fournisseur Invitrogen par ClonTech). La poursuite de ces travaux de recherche est cependant en partie dépendante de l'obtention de financements complémentaires et plusieurs propositions de projets ont été déposées dans ce but, auprès d'institutions de l'Etat de Bahia, du gouvernement fédéral du Brésil ou à un niveau international (International Foundation for Science).

Afin de contribuer à l'avancement de ces travaux et de renforcer la partenariat avec UESC, il est proposé de faire venir à Montpellier un chercheur de l'UESC dans le cadre d'une bourse DESI (sujet : révélation de macroarrays par radioactivité ; date prévue : 2<sup>ème</sup> trimestre 2004). La période de stage sera choisie de façon à coïncider avec une période de présence de F. Micheli à Montpellier (avant ou après ses congés annuels). Ainsi, ce stage permettra aussi de mieux mettre en relation les recherches conduites au Brésil dans la cadre du partenariat UESC-Cirad avec le dispositif de recherche sur le cacao du Cirad (Cp/Cacao et AMIS/Biotrop) à Montpellier.

Pour des informations complémentaires, le lecteur est invité à se reporter au très complet rapport d'activité 2002-2003 de F. Micheli qui détaille la structure du laboratoire de «génomique et expression génétique», les activités de recherche et d'enseignement conduites, les collaborations inter institutionnelles établies, les projets en montage et les perspectives de publication (voir Annexe 1).

### **3. Négociation avec le CEPEC**

Le CEPEC est le centre public de recherche sur le cacao de l'Etat de Bahia. C'est aussi le principal centre de recherche sur le cacao du Brésil. Sa station centrale de recherche (avec ses laboratoires) est située entre Ilhéus et Itabuna, à quelques kilomètres du campus de l'UESC.

Le mandat, l'organisation et la situation actuelle du CEPEC étant décrits dans le rapport de mission au Brésil de D. Clement en novembre-décembre 2003 (n° CP1680), le présent rapport porte uniquement sur les modalités d'un rapprochement entre le Programme Cacao du Cirad et le CEPEC.

#### **3.1 Antécédents**

De par son dispositif scientifique (chercheurs, laboratoires, stations expérimentales, ressources génétiques), le CEPEC est reconnu comme l'une des toutes premières institutions de recherche publique sur le cacao des divers pays producteurs, même si il a souffert ces dernières années de réductions budgétaires et du départ de plusieurs de ses chercheurs. De plus, les thématiques de recherche pouvant être conduites au Brésil, notamment dans le domaine de la sélection assistée pour la résistance des cacaoyers aux maladies fongiques, sont en accord avec les priorités de la programmation scientifique du Programme Cacao du Cirad. C'est pourquoi l'objectif de mise en place d'une collaboration renforcée entre le Cirad et le CEPEC a été retenu par le programme Cacao, le département des Cultures Pérennes et la direction générale du Cirad.

Cependant et en dépit de contacts établis depuis de nombreuses années, ces perspectives de collaboration se sont longtemps heurtées à un manque d'ouverture du CEPEC et à un souhait de sa direction de limiter notre rôle à celui de fournisseur (gratuit) d'expertise scientifique et de force de travail. Confronté à diverses difficultés financières (réduction budgétaire suite à la chute de la production nationale) et institutionnelles (remise en cause du statut particulier du CEPEC, qui ne fait pas partie de l'Embrapa), cette position du CEPEC a commencé à évoluer et des négociations se sont engagées depuis trois ans en vue de la mise en place de collaborations renforcées. Plusieurs missions ont été effectuées au Brésil et des discussions Cirad/CEPEC ont été tenues à l'occasion de diverses rencontres internationales (colloque final Caobisco, ateliers du projet CFC/ICCO/IPGRI, réunions USDA/ARS, 14ème Conférence Internationale Cacao....).

Cette négociation s'est accélérée en 2003 suite à trois événements :



- Un changement à la direction du CEPEC, avec la nomination au poste de Directeur Exécutif du Dr Uilson Lopes, chercheur connaissant bien le CIRAD et ayant toujours fait preuve d'une grande ouverture scientifique et institutionnelle
- La démission du chercheur brésilien en charge du laboratoire de marquage moléculaire du CEPEC, conduisant à des retards importants sur l'un de ses projets «phares», le projet CFC/Biomol
- L'insertion réussie de F. Micheli à l'UESC, (institution voisine du CEPEC et avec laquelle des collaborations existent)

### 3.2. Responsabilités du chercheur CIRAD accueilli au CEPEC

L'ensemble des contacts et négociations menées depuis 3 ans conduisent à la proposition d'affectation au CEPEC, fin 2004, d'un généticien cacao maîtrisant les outils moléculaires et pouvant intégrer ces outils dans une stratégie de sélection.

Ce généticien serait Didier Clément qui est lui même favorable à cette affectation.

Les responsabilités de D. Clément au CEPEC concerneraient principalement la coordination du laboratoire de Biologie moléculaire de l'équipe génétique cacao. Les travaux seraient les suivants :

- une contribution aux recherches du projet CFC/Biomol<sup>3</sup> et à diverses études de Sélection Assistée par Marqueurs et de recherche de QTL (y compris dans le cadre du nouveau projet CFC/IPGRI sur la sélection participative)
- l'organisation du laboratoire et le renforcement de ses capacités d'accueil et de formation. Cet accueil pourrait concerner notamment des étudiants (en particulier de l'UESC) et des scientifiques sud-américains (Pérou, Bolivie...),
- la liaison avec UESC (sur Cacao et Hévéa) dans son domaine de compétence,
- le montage de nouveaux projets (dont une seconde phase au projet CFC/Biomol qui pourrait ouvrir ses travaux à la résistance du cacaoyer à la Moniliose) permettant d'assurer rapidement une part d'autofinancement de ce poste au Brésil.

(pour plus de précisions sur ces activités, voir rapport D. Clément)

Cette affectation aurait une durée initiale de 2 ou 3 ans, à partir de septembre/octobre 2004. Un contrat sera établi entre le CIRAD et le CEPEC (sur la base du contrat existant entre l'UESC et le CIRAD pour l'accueil de F. Micheli). Vis à vis des autorités brésiliennes, D. Clément aura un statut de «visiting scientist».

La liaison proposée entre cette affectation de D. Clément et le projet CFC/Biomol est considérée par le Programme Cacao comme un facteur favorable pour les raisons suivantes :

- ce projet apporte un gage d'efficacité dans la conduite des opérations de recherche car son financement spécifique permet de maintenir une grande motivation du personnel d'appui du CEPEC et de faciliter l'achat des réactifs et matériels de laboratoire nécessaires,

<sup>3</sup> Y compris éventuellement pour des missions scientifiques au Pérou prévues dans le cadre du Projet BioMol



- cet appui du Cirad sur ce projet, dont la phase actuelle devrait être prolongée jusqu'à fin 2005, sera officialisé auprès du CFC (contact à prendre avec M. Clayton), et le Cirad sera associé à diverses publications et communications liées à ce projet,
- le Cirad se positionne ainsi comme un partenaire important d'une seconde phase de ce projet CFC/BioMol qui pourrait être initiée à partir de 2006.

### 3.3. Financement :

La question du financement de ce poste de chercheur Cirad mis à disposition du CEPEC a été discutée avec son directeur. Ce problème de financement a été bien compris et la direction du CEPEC s'est engagée :

- à étudier ses propres disponibilités financières, mais celles-ci sont a priori très limitées,
- à engager des démarches pour obtenir une bourse d'appui brésilienne (via CNPq),
- à ouvrir au Cirad le bénéfice de financements d'appui du CFC, lors de la seconde phase du projet CFC/Biomol.

De son côté, le Cirad va prospecter les possibilités d'appui existants dans le cadre des bourses européennes (Alban, Marie-Curie).

Les deux partenaires, Cirad et CEPEC, se sont mis d'accord pour que cette recherche de financement n'implique pas, initialement et pour les activités de recherche, une troisième institution (notamment privée comme Mars/Masterfoods) qui limiterait nos marges de manœuvre et notre future capacité de négociation.

Par contre, le Cirad approchera USDA/ARS sur les possibilités de bénéficier d'un appui financier dans le cadre des activités de formation de chercheurs d'Amérique Latine. En effet, la présence de D. Clement à Ilhéus permettra d'améliorer la capacité d'accueil et de formation du CEPEC en Biologie Moléculaire appliquée à l'amélioration génétique du cacaoyer, et cette expertise Cirad pourrait être soutenue par les composantes « formation » de divers projets cacao à financements nord-américains actuellement conduits en Equateur, au Pérou, en Colombie ou en Bolivie.....

### 3.4. Perspectives de mise en œuvre

Dès décembre 2003, une première version d'un accord CEPEC/Cirad pour cet accueil a été envoyée au Dr Uilson Lopes. (voir texte en annexe 2) Ce texte est actuellement étudié par le CEPEC.

Grâce à l'appui financier du MAE, il est aussi prévu que D. Clement se rende en mission au Brésil en avril/mai 2004, pour, d'une part, démarrer certaines analyses de données et des travaux de laboratoires liés à sa future affectation, et, d'autre part, poursuivre le montage administratif et institutionnel de cette collaboration.

- cet appui du Cirad sur ce projet, dont la phase actuelle devrait être prolongée jusqu'à fin 2005, sera officialisé auprès du CFC (contact à prendre avec M. Clayton), et le Cirad sera associé à diverses publications et communications liées à ce projet,
- le Cirad se positionne ainsi comme un partenaire important d'une seconde phase de ce projet CFC/BioMol qui pourrait être initiée à partir de 2006.

### 3.3. Financement :

La question du financement de ce poste de chercheur Cirad mis à disposition du CEPEC a été discutée avec son directeur. Ce problème de financement a été bien compris et la direction du CEPEC s'est engagée :

- à étudier ses propres disponibilités financières, mais celles-ci sont a priori très limitées,
- à engager des démarches pour obtenir une bourse d'appui brésilienne (via CNPq),
- à ouvrir au Cirad le bénéfice de financements d'appui du CFC, lors de la seconde phase du projet CFC/Biomol.

De son côté, le Cirad va prospector les possibilités d'appui existants dans le cadre des bourses européennes (Alban, Marie-Curie).

Les deux partenaires, Cirad et CEPEC, se sont mis d'accord pour que cette recherche de financement n'implique pas, initialement et pour les activités de recherche, une troisième institution (notamment privée comme Mars/Masterfoods) qui limiterait nos marges de manœuvre et notre future capacité de négociation.

Par contre, le Cirad approchera USDA/ARS sur les possibilités de bénéficier d'un appui financier dans le cadre des activités de formation de chercheurs d'Amérique Latine. En effet, la présence de D. Clement à Ilhéus permettra d'améliorer la capacité d'accueil et de formation du CEPEC en Biologie Moléculaire appliquée à l'amélioration génétique du cacaoyer, et cette expertise Cirad pourrait être soutenue par les composantes « formation » de divers projets cacao à financements nord-américains actuellement conduits en Equateur, au Pérou, en Colombie ou en Bolivie.....

### 3.4. Perspectives de mise en œuvre

Dès décembre 2003, une première version d'un accord CEPEC/Cirad pour cet accueil a été envoyée au Dr Uilson Lopes. (voir texte en annexe 2) Ce texte est actuellement étudié par le CEPEC.

Grâce à l'appui financier du MAE, il est aussi prévu que D. Clement se rende en mission au Brésil en avril/mai 2004, pour, d'une part, démarrer certaines analyses de données et des travaux de laboratoires liés à sa future affectation, et, d'autre part, poursuivre le montage administratif et institutionnel de cette collaboration.

- avec CEPEC, sur des activités de Biologie Moléculaire : le directeur du CEPEC nous a fait part de son souhait de collaborer avec le Programme Hévéa dans le domaine des biotechnologies, mais sans préciser les questions de recherche prioritaire. Dans un premier temps, il semble possible de demander à D. Clement, lorsqu'il sera en poste au Cepec, d'aider à identifier des axes précis de collaboration bilatérale, et éventuellement de co-encadrer des étudiants de l'UESC qui seraient accueillis au CEPEC pour des recherches sur Hévéa.
- avec CEPEC dans un cadre régional: Le directeur du CEPEC est très intéressé par le montage avec le Cirad d'un projet régional sud-américain portant sur l'optimisation de l'association cacaoyer-hévéa, association considérée comme un exemple de système agroforestier. Les travaux porteraient sur les dispositifs de plantation, les interactions lumière/maladie/eau/nutriments entre peuplements associés, l'optimisation du choix des clones d'hévéa en fonction de la pression de la maladie des feuilles, etc. Le CEPEC souhaite entrer en contact avec F. Rivano, du Programme Hévéa en poste en Colombie, et avec les centres de recherche des pays voisins pour monter une proposition de projet régional dans le cadre de Procitropicos .(Il faut noter qu'un tel projet de recherche pourrait être mis en relation avec le projet de nouvelle plantation Hévéa/Cacao de Michelin pour y faire héberger des dispositifs expérimentaux simplifiés mais à grande échelle.)

Le directeur du CEPEC souhaite recevoir la visite du responsable du Programme Hévéa du Cirad pour discuter de ces possibilités de collaboration. Cette visite pourrait avoir lieu à l'occasion du prochain séminaire Michelin/Cirad qui se tiendra près de Salvador de Bahia en avril 2004.

#### 4.3. Contact avec une mission Banque Mondiale :

Deux responsables du département Afrique de la Banque Mondiale (J. Bond et J. Toledano), invités au Brésil par la société Mars/Masterfoods pour mieux connaître les actions de recherche et d'appui au développement en cacaoculture dans ce pays, ont été rencontrés au cours de la mission.

Les points à retenir des discussions avec ces responsables sont les suivants :

- La Banque Mondiale est disposée à appuyer des actions de recherche, y compris dans des domaines assez fondamentaux comme les biotechnologies, considérant que la nécessaire « modernisation » de l'agriculture tropicale doit pouvoir disposer d'une bonne base scientifique et que les innovations proposées doivent être marquantes sur les rendements, la productivité, la résistance aux maladies... pour pouvoir être facilement adoptées par les producteurs.
- Pour mettre au point des mécanismes efficaces de transfert de technologie, différents outils doivent être développés parmi lesquels des mécanismes de connexion des systèmes de production avec les marchés (locaux ou internationaux), des outils d'aide à la décision, des études de prospective et des systèmes de modélisation agro-économique des exploitations.



- L'objectif de la protection de la biodiversité (par exemple via des systèmes agroforestiers diversifiés) est important mais sa mise en oeuvre ne peut ignorer l'exigence de rentabilité économique des systèmes proposés. La question posée est donc de savoir comment donner de la valeur marchande à la biodiversité.
- La Banque Mondiale envisage d'apporter son concours financier pour des projets d'appui à la cacaoculture en Afrique, mais souhaite être sollicitée à cet effet par les gouvernements des pays producteurs.

## 6. Conclusion

Il apparaît que les objectifs fixés pour cette mission ont été atteints. Nous avons pu vérifier la bonne insertion personnelle et professionnelle de F. Micheli à l'UESC, et évaluer ses perspectives de recherche pour l'année 2004. Des actions ont été proposées pour renforcer le partenariat entre le programme Cacao du CIRAD et l'UESC, et pour faciliter le rapprochement entre les activités de F. Micheli à l'UESC au Brésil et celles des laboratoires du CIRAD à Montpellier.

Concernant le partenariat CIRAD / CEPEC, les modalités d'affectation de D. Clement au CEPEC fin 2004 ont été définies et la rédaction d'un accord cadre de partenariat a été engagée. La nécessité d'obtenir un financement complémentaire pour pérenniser cette affectation a été soulignée et des pistes possibles identifiées. Cette affectation devrait donc pouvoir être réalisée fin 2004, et différentes activités préparatoires à ce départ ont été décidées.

Les contacts établis avec le directeur et les chercheurs de la ferme expérimentale Almirante Cacao (appartenant à la société Mars/Masterfoods) permettent d'envisager un renforcement de notre collaboration avec cette institution. A court terme, ce renforcement pourrait prendre la forme de l'accueil par Almirante d'étudiants sélectionnés et co-encadrés par des chercheurs du Cirad.

Concernant les recherches sur Hévéa, 4 possibilités de collaboration avec le Cirad ont été identifiées. Elles impliqueraient Michelin, l'UESC et le CEPEC, et couvrent différents sujets dont l'étude de l'association culturelle Hévéa-Cacao.



# **A N N E X E 1**

## **RAPPORT ACTIVITES**

**Fabienne MICHELI**

## **Rapport d'activités**

**Fabienne Micheli**

**24 décembre 2002-12 décembre 2003**

### **1. Contexte du rapport d'activités**

Le présent rapport fait suite à celui concernant la période du 19 septembre 2002 au 24 décembre 2002 (à l'attention de la DRH) et décrit les activités que j'ai effectuées au cours de l'année passée (24 décembre 2002-12 décembre 2003) dans le cadre de mon affectation à l'Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC, Ilhéus-BA, Brésil) dans le laboratoire «Genômica e Expressão Gênica» dirigé par le Dr. Júlio Cascardo. Ce partenariat entre l'UESC et le CIRAD porte sur l'étude de l'interaction cacaoyer-*Crinipellis perniciosa* (maladie du balai de sorcière).

Les points suivants sont développés ci-après :

- évolution de la structure du laboratoire ;
- activités de recherche et d'enseignement ;
- évolution des collaborations avec les différentes institutions brésiliennes travaillant en recherche cacaoyère ;
- recherche d'appuis financiers ;
- valorisation des résultats déjà obtenus.

### **2. Structure du laboratoire d'accueil «Genômica e Expressão Gênica» de l'UESC**

#### **2.1. Composition de l'équipe**

La composition de l'équipe ne s'est pas modifiée en nombre de chercheurs, d'enseignants-chercheurs et de techniciens. Toutefois, deux des enseignants-chercheurs, Fatima Alvim et Aassia Leal Pires, ayant comme niveau actuel un DEA, ont obtenu un financement de la CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior / PQI, Programme de Qualification Institutionnelle) ainsi qu'un allègement de leurs enseignements de la part de l'UESC, pour effectuer leur doctorat (en collaboration avec Unicamp, Campinas-SP, Brésil).

Le laboratoire accueille de nombreux étudiants de licence, maîtrise, DEA (mestrado) effectuant leur formation dans les disciplines suivantes : agronomie, génétique, cytologie, microbiologie.

Le laboratoire de «Genômica e Expressão Gênica» travaille, au sein de l'UESC, en étroite collaboration avec les laboratoires de :

- « Bioinformática » dirigé par Diego Gervesio Friás Suárez (Dr en physique nucléaire et enseignant-chercheur en bioinformatique), et composé d'un chercheur en bioinformatique (financé par le CNPq), Nicolas Carels, et de nombreux étudiants de premier cycle universitaire ;
- « Cytogenética » dont la direction a été reprise par Marco Antonio Costa (cytologiste) et Fernanda Gaiotto (généticienne). Dans le cadre de la

restructuration de ce laboratoire, un enseignant-chercheur devrait être recruté d'ici la fin de l'année 2003.

D'autre part, la direction de l'UESC ainsi que celle du Département des Sciences Biologiques (DCB) ont été modifiées dans le cadre du renouvellement des mandats officiels liés à ces fonctions : le nouveau recteur de l'UESC est désormais Joaquim Bastos (vice-recteur Lourice Lessa), économiste de formation et enseignant à l'UESC depuis 1974 ; et le nouveau chef du DCB est Ronan Xavier Correa, agronome.

## **2.2. Locaux et équipement**

Dans mon précédent rapport, je faisais part de problèmes liés à un manque de locaux (laboratoires et bureaux). Au cours de l'année passée, ces problèmes ont été en grande partie résolus par la construction et/ou l'aménagement des locaux suivants :

- création de nouveaux bureaux au rez-de-chaussée de l'UESC et re-distribution des anciens bureaux ;
- aménagement du laboratoire de « Bioinformática » avec mise en place de nouveaux postes de travail (ordinateurs) et création d'espaces réservés aux bureaux ;
- déménagement du laboratoire de « Cytogenética » et libération de l'espace qu'il occupait précédemment au profit du laboratoire de « Genômica e Expressão Gênica ». Le laboratoire de « Cytogenética » qui deviendra suite à un changement de direction et de thématiques le laboratoire de « Cytogenética e Marcadores Moleculares » est actuellement en pleine re-organisation (voir § 2.1.). Dans ce contexte de nouveaux équipements ont été acquis, en particulier un séquenceur AB377 (Perkin Elmer) et un microscope à fluorescence.

D'autre part, la construction d'un nouveau bâtiment est prévue dans les prochaines années et devrait permettre à l'ensemble des laboratoires du Département des Sciences Biologiques de s'entendre.

## **3. Activités de recherche : étude de l'interaction cacaoyer-*Crinipellis perniciosa***

### **3.1 Programme général**

Le programme général reste celui décrit dans mon précédent rapport : étude de l'interaction cacao-*Crinipellis* par différentes approches (biologie moléculaire, biochimie, physiologie...) afin d'obtenir des résultats complémentaires permettant une meilleure compréhension globale du processus d'interaction. Les expériences sont menées en parallèle sur le champignon et sur la plante avec comme objectif d'obtenir des gènes impliqués dans la résistance du cacaoyer à *Crinipellis*.

Ne sont développées dans les paragraphes suivants que les expériences auxquelles j'ai participé.

### **3.2. Matériel végétal**

Des cacaoyers sensibles (Catongo) et résistants (TSH1188) à *Crinipellis perniciosa* sont cultivés en serre (Figure 1A) à la CEPLAC-Bahia (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira, voir §5.1.) par Karina Gramacho (phytopathologiste), et sont inoculés

selon la méthode d'aspersion (Figure 1B) avec un mélange de spores de différentes souches de *Crinipellis* (de façon à représenter la variabilité du champignon). Des plantes contrôle (sans inoculation) sont également cultivées. De façon à couvrir toutes les phases de la maladie, le matériel végétal est collecté à 24, 48, 72h après inoculation et ensuite tous les 5 jours jusqu'à environ 70 jours, période à laquelle apparaissent les étapes finale de la maladie (présence d'un balai sec).



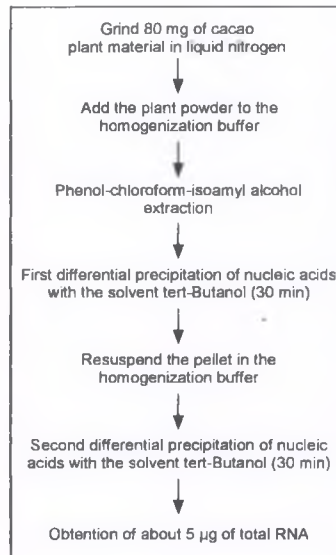
**Figure 1.** Culture et inoculation du matériel végétal à la CEPLAC. A. Les plants de *Theobroma cacao* résistant (TSH1188) et sensible (Catongo) au balai de sorcière sont cultivés en serre dans des conditions de température et d'hygrométrie contrôlées. B. Inoculation des plantes par aspersion.

### 3.3. Organisation des expériences

#### 3.3.1. Développement d'un nouveau protocole d'extraction d'ARN total

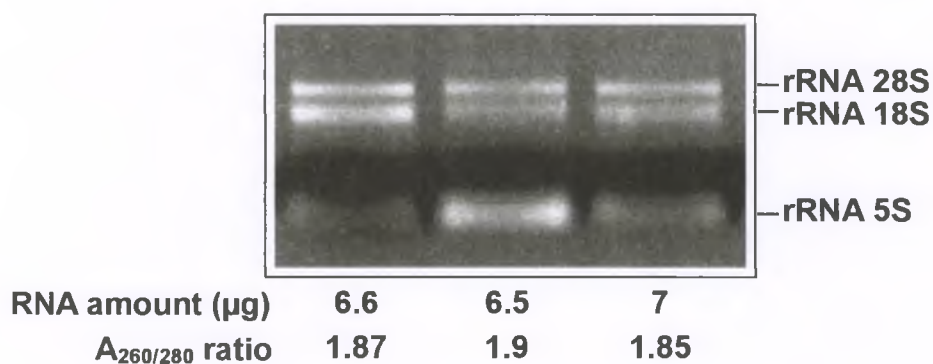
Il existe déjà de nombreux protocoles permettant d'isoler l'ARN total de plantes récalcitrantes [1-5] y compris ceux optimisés pour les plantes ligneuses [6], et très peu d'entre eux concernent l'isolement d'ARN de cacao [7-9]. De plus, ces trois derniers protocoles utilisent, soit l'ultracentrifugation sur chlorure de césium, soit aboutissent à l'extraction de faibles quantités d'ARN. L'isolement d'ARN total de cacaoyer a d'abord été entrepris au laboratoire de «Genômica e Expressão Gênica» à l'aide de méthodes d'extractions classiques ou utilisant des kits disponibles dans le commerce, sans succès. C'est pourquoi, nous avons mis au point une méthode d'extraction d'ARN fiable et efficace à partir d'organes de cacao infectés ou non par *Crinipellis* (feuilles, méristèmes et fruits). Ce nouveau protocole utilise le tert-Butanol et s'affranchit des problèmes associés à la présence, dans les tissus du cacao, de polyphénols et de polysaccharides (Figure 2). De plus, ce protocole utilise une méthode sans étape d'ultracentrifugation qui peut être appliquée dans n'importe quel laboratoire et avec un faible coût.





**Figure 2.** Etapes du protocole d'extraction de l'ARN total de cacaoyer mis au point au laboratoire de «Genômica e Expressão Gênica » de l'UESC.

La qualité de l'ARN obtenu a été estimée spectrophotométriquement : le ratio  $A_{260}/A_{280}$  d'approximativement 1,85 montre que cet ARN est d'excellente qualité. La qualité de l'ARN a également été vérifiée sur gel d'agarose 1% traité au DEPC par visualisation des ARNr majeurs: les bandes correspondant aux ARNr 28S, 18S et 5S sont détectées pour tous les échantillons provenant des différents organes de cacaoyers infectés ou non par *Crinipellis*. L'ARN est obtenu avec un bon rendement : environ 5 µg pour 80 mg de matériel végétal broyé soit environ 60 ng d'ARN total par mg de tissu (Figure 3).



**Figure 3.** ARN total isolé à partir de 80 mg de feuilles de cacaoyer à l'aide du protocole utilisant le tert-Butanol. La quantité et la qualité de l'ARN ont été mesurées à  $A_{260}$  et  $A_{260/280}$ , respectivement.

L'ARN de chacun des points des cinétiques d'interaction TSH1188-*Crinipellis* et Catongo-*Crinipellis* (voir §3.2.) est extrait selon la méthode décrite ci-dessus. Une partie de ces ARNs est conservée sous forme d'aliquotes séparés et stockés à  $-80^{\circ}\text{C}$ , et pourra être utilisée dans des expériences ultérieures (arrays, voir § 8.1.). Le reste des échantillons est poolé et utilisé pour la confection des banques d'ADNc.

### 3.3.2. Construction de deux banques d'ADNc et séquençage des ESTs correspondantes

L'objectif du travail est d'obtenir deux banques d'ADNc correspondant respectivement à l'interaction résistante TSH1188-*Crinipellis* et à l'interaction sensible Catongo-*Crinipellis*. Les banques sont faites à partir des ARNs poolés.

Comme annoncé dans mon précédent rapport, nous avons tout d'abord utilisé le kit « Superscript Plasmid System with Gateway Technology for cDNA Synthesis and Cloning » d'Invitrogen pour synthétiser les banques d'ADNc. Malheureusement, dû à un défaut de fabrication du kit en question (contamination avec des séquences bactériennes), nos travaux ont été retardés et n'ont, dans un premier temps, pas donné les résultats escomptés. Après comparaison de nos résultats avec ceux, identiques, des laboratoires de l'Université Fédérale de São Carlos (São Paulo, projet « Camarão ») et de l'Université Fédérale de Rio Grande do Sul (projet « Eucalyptus »), nous avons fait appel au service juridique de la FAPESB (qui finance, pour la majeure partie, le projet « cDNA cacao-*Crinipellis* ») de façon à obtenir un remboursement des préjudices subis : perte des 10 000 réais d'investissement en consommable, perte du matériel végétal, retard dans les travaux des chercheurs et étudiants ayant à justifier leurs activités auprès des organismes finançant leurs recherches, retard dans la publication des travaux (journaux internationaux et conférences). Le service juridique de la FAPESB a, pour l'instant, obtenu un accord avec Invitrogen consistant en un remboursement des préjudices sous forme de consommables (voir Annexe1).

La construction des deux banques d'ADNc a finalement été effectuée à l'aide du « Kit Creator SMART cDNA Library Construction » de Clontech.

Les ESTs correspondant à l'interaction Catongo-*Crinipellis* sont actuellement en cours de séquençage. Il est prévu de séquencer 5000 ESTs de chacune des banques, soit 10 000 ESTs au total.

Les séquences obtenues sont analysées par des méthodes informatiques (comparaison de séquences avec celles des banques de données publiques, analyse du pourcentage en GC, séparation des séquences de cacao et de champignon...) au laboratoire de « Bioinformatica ».

### 3.3.3. Etude cytologique de l'interaction cacao-*Crinipellis*

Cette étude, développée en collaboration avec Laurence Alemanno (Cirad-Cp, Programme Cacao, Montpellier), consiste en l'analyse cytologique (microscopie optique) de l'interaction cacao-*Crinipellis* de façon à visualiser la progression du champignon lors de l'infection.

J'ai effectué la fixation du matériel végétal (méristèmes de TSH1188 et de Catongo inoculés et non inoculés par *Crinipellis*) à l'aide d'un protocole mis au point par Laurence à Montpellier. Les échantillons fixés et conservés dans l'éthanol 70% ont été envoyés à Laurence qui termine actuellement leur analyse.

Après discussion avec Karina Gramacho et Régina Machado, lors de leur passage respectif à Montpellier (voir § 5.1. et 5.5.), il s'est avéré que cette étude pourrait être intégrée dans un projet plus large qui comprendrait entre autre des analyses en microscopie

électronique et en hybridation *in situ* (étude *in situ* de l'expression de gènes de cacao et de champignon).

#### **4. Activités d'enseignement et d'encadrement**

##### **4.1. Enseignement**

En remplacement de Fatina Alvim (voir §2.1.), j'ai effectué pendant 2 mois, pour 3h par semaine, des enseignements théoriques de maîtrise portant sur la transgenèse végétale (module de Biotechnologies). Ces enseignements se divisent en deux parties : cours théoriques, et analyses d'articles donnant lieu à une évaluation comptant pour moitié de la note totale attribuée au module.

##### **4.2. Encadrement d'étudiants de mestrado de « Genética e Biologia Molecular »**

Le mestrado est l'équivalent du DEA français, mais contrairement à celui-ci s'effectue sur une période de 2 ans. La première année est consacrée aux enseignements théoriques (cours, séminaires, épreuves écrites et orales...), alors que la seconde est réservée au développement du sujet de recherche de l'étudiant (travail en laboratoire finalisé par la rédaction d'un mémoire et par une soutenance effectuée devant la Commission d'Orientation). Toutefois, en fonction des modules choisis par l'étudiant et du temps libre dont il dispose la première année, il peut, si il le souhaite, commencer ses travaux de recherche plus tôt, sachant que, pour soutenir son mestrado, il devra posséder au moins une publication soumise (voire acceptée ou publiée) dans une revue internationale à comité de lecture.

L'autorisation à encadrer un étudiant de mestrado est délivrée par le « Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular » sur la base de la possession, par le futur encadrant, d'un doctorat, de, si possible, 5 articles publiés au cours des 5 dernières années dans des journaux internationaux à comité de lecture, et de l'approbation (vote) du « Colegiado ». Le futur encadrant doit, en outre, appartenir à un Groupe de Recherche de l'UESC. Des exceptions sont toutefois possibles, en particulier pour les chercheurs d'autres institutions qui seraient amenés à participer à l'encadrement d'étudiants de mestrado.

La Commission d'Orientation de l'étudiant comprend un encadrant principal et deux co-encadrants. Les trois devant être titulaires d'un doctorat.

##### **4.2.1. Promotion 2002-2004**

La promotion 2002-2004 constitue la première promotion du mestrado de « Genética e Biologia Molecular » de l'UESC.

De cette promotion, je co-encadre le travail de Geruza de Oliveira Ceita (Encadrant : Júlio Cascardo ; autre co-encadrant : Delmira Costa). Ce travail porte sur l'« Analyse de gènes impliqués dans le processus de mort cellulaire chez *Theobroma cacao* inoculé par *Crinipellis pernicioso* », à l'aide d'approches moléculaires (étude d'expression de gènes), biochimiques (étude d'expression de protéines) et cytologiques (suivi des critères cytologiques de mort cellulaire au cours du temps). Geruza partage son temps entre la CEPLAC (participation de Karina Gramacho) pour la culture et l'inoculation des plantes ainsi



que pour une partie des expériences de cytologie, et le laboratoire de «Genômica e Expressão Gênica » de l'UESC pour la partie biologie moléculaire et étude de protéines.

#### 4.2.2. Promotion 2003-2005

De la promotion 2003-2005, je suis responsable de :

- l'encadrement principal du travail de Maíza Alves Lopes : « Caractérisation de gènes impliqués dans le métabolisme de la chitine chez *Crinipellis pernicioso* ». Co-encadrants : Abelmon Gesteira et Júlio Cascardo ;
- le co-encadrement des travaux de :
  - o Claudine Gonçalves de Oliveira : « Développement et caractérisation de marqueurs microsatellites pour les espèces sylvestres natives de la Mata Atlântica Brasileira ». Encadrant : Fernanda Gaiotto ; autre co-encadrant : Andréa Mariano ;
  - o Dorival de Freitas Filho : « Etude des transporteurs ABC de détoxification chez *Crinipellis pernicioso* ». Encadrant : Júlio Cascardo ; autre co-encadrant : Abelmon Gesteira ;
  - o Stênio Carvalho Santos: « Etude de la famille multigénique des hydrophobines chez *Crinipellis pernicioso* ». Encadrant : Júlio Cascardo ; autre co-encadrant : Abelmon Gesteira ;
  - o Dahyana Santo Britto : « Etudes fonctionnelles de gènes codant pour des protéines PR (pathogenesis related proteins) exprimées chez *Theobroma cacao* en réponse à l'attaque de *Crinipellis pernicioso*. Encadrant : Abelmon Gesteira ; autre co-encadrant : Andréa Mariano.

Ces étudiants, effectuant actuellement leur première année de mestrado, n'ont, pour la plupart, pas encore initié leurs travaux expérimentaux, à l'exception de Maíza Alves Lopes. Maíza possède une bourse de technicienne ainsi qu'un financement de recherche provenant de l'Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS-BA). Son travail, initié à l'UEFS par une analyse bioinformatique du génome de *Crinipellis*, consiste en l'obtention de gènes de chitinase de *Crinipellis* (petite famille multigénique), en l'étude de l'expression du ou des gènes obtenus au cours du cycle de vie du champignon, en la surexpression de la chitinase principale en système hétérologue (bactérien) pour la synthèse d'anticorps anti-chitinase qui serviront à l'analyse de l'expression de la protéine au cours de l'infection du cacao par *Crinipellis* (analyse protéique du fluide apoplastique).

### 5. Collaborations

#### 5.1. CEPLAC/CEPEC Bahia

L'UESC collabore, pour l'inoculation et le maintien des plantes nécessaires aux différentes expériences, avec la CEPLAC-Bahia et plus particulièrement avec Karina Gramacho, phytopathologiste. Les relations entre les deux instituts se sont depuis mon arrivée nettement améliorées, en raison : (i) du changement de direction du CEPEC, Uilson Lopez étant désormais le nouveau directeur ; (ii) des différentes missions effectuées par le Programme Cacao à Ilhéus (en octobre 2002 et novembre 2003) ; (iii) de la venue à Montpellier (Cirad-AMIS) dans le cadre d'un stage DESI (6 semaines) de Karina Gramacho (utilisation de marqueurs microsatellites pour l'étude la diversité de *Crinipellis*) ; (iv) de la relation de confiance que nous avons réussi à établir entre les membres du Cirad et ceux de la CEPLAC.



En effet, Uilson Lopez semble être très favorable au développement de plus amples collaborations entre la CEPLAC et le Cirad. Dans ce contexte, Didier Clément (Cirad-Cp, Programme Cacao) a effectué une mission au CEPEC, en novembre 2003 avec pour objectif de finaliser une proposition de partenariat concernant son affectation au CEPEC au cours du second semestre 2004. Cette mission de 3 semaines (financement MAE) a permis de définir clairement la nature du poste (breeding avec forte composante biologie moléculaire) ainsi que le positionnement de Didier Clément dans les projets en cours et futurs. La venue de Philippe Petithuguenin, chef du Programme Cacao, lors de la troisième semaine a également permis de préciser les relations institutionnelles entre le Cirad-Cp et le CEPEC. Le bilan de cette mission est très positif et devrait en toute logique conduire à la réalisation de ce partenariat, qui permettra au programme cacao de renforcer son impact au Brésil à travers l'étude génétique de la résistance au balai de sorcière. Ce partenariat permettra également aux travers de projets en cours d'avoir un impact régional avec des actions sur le Pérou et l'Equateur.

## **5.2. Cirad Cp-Programme Hévée / Michelin**

Dans mon précédent rapport, je mentionnais la possibilité d'une collaboration entre le Cirad-Cp Programme Hévée (Dominique Garcia actuellement en poste à Rondonopolis sur la Plantation Michelin Mato Grosso) et l'UESC sur l'étude de l'interaction hévéa-*Microcyclus ulei* par génomique fonctionnelle. Dans ce contexte, une réunion comprenant Júlio Cascardo, Dominique Garcia, Carlos Mattos (phytopathologiste, Michelin) et moi-même a été effectuée à l'UESC en mai 2003. Suite à cette réunion, il semble que les partenaires potentiels de cette collaboration se soient entendus sur le fait que Dominique Garcia pourrait, en fonction des décisions prises par le Programme Hévée, être affecté à l'UESC au cours de l'année 2004, pour développer le projet « ESTs hévéa-*Microcyclus* ». Le matériel végétal nécessaire à cette étude serait cultivé et inoculé, en collaboration avec Carlos Mattos, sur la Plantation Michelin Bahia où Dominique passerait 30% de son temps (les 70% restant étant consacrés au travail de biologie moléculaire à l'UESC). Le laboratoire de « Genômica e Expressão Gênica » de l'UESC fournirait les locaux, l'équipement ainsi que les moyens humains (chercheurs et étudiants) pour le développement du projet. Toutefois, le financement des recherches (consommables) devra être obtenu indépendamment (voir § 8.2.).

La finalisation de ce projet de collaboration dépend, d'une part des orientations thématiques du Programme Hévée, et d'autre part de l'obtention d'un financement pour les recherches que Dominique Garcia souhaite développer.

## **5.3. Fazenda Almirante Cacao (Masterfoods)**

Jusqu'à présent, et bien que les relations entre l'UESC et Almirante soient cordiales, aucune collaboration entre ces deux institutions n'a été clairement établie. Les différents protagonistes (Allan Pomela et Régina Machado entre autres) affichent une volonté de collaboration sur différents aspects de l'interaction cacao-*Crinipellis* (e.g. étude moléculaire des endophytes du cacaoyer) qui, malheureusement, semble avoir des difficultés à se concrétiser.

Actuellement, le projet le plus avancé concerne l'analyse cytologique de l'interaction cacao-*Crinipellis* initié entre Régina Machado, Laurence Alemanno, Karina Gramacho et moi-même. Régina, lors d'un passage au Cirad à Montpellier en octobre 2003, a pu discuter

avec Laurence des perspectives de ce travail ainsi que des possibilités de demande d'appui financier pour le développement du projet (voir § 8.2.).

## **5.4. Autres contacts**

### **5.4.1. Cirad**

Au cours de cette année différentes missions Cirad ont été effectuées à l'UESC :

- mai 2003 : visite de Dominique Garcia (Cirad-Cp) et de Carlos Mattos (Michelin), voir § 5.2. ;
- septembre 2003 : visite de Guy Self (Cirad-FLHOR, en poste à l'Embrapa Semi-Arido, Petrolina-PE, Brésil) qui, dans le cadre de son travail sur le traitement post-récolte de la mangue, a souhaité rencontrer Júlio Cascardo, Gilmar Vieira et Célio Kersul (UESC, Agronomia), ainsi que José Luis Pirez et Karina Gramacho (CEPEC) ;
- octobre 2003 : rencontre de Ferran Jori (Cirad-EMVT, Montpellier), qui effectuait une visite à des collaborateurs d'un projet INCO PECARI (Sergio Nogueira et Selene Nogueira, UESC, Biologie Animale);
- novembre-décembre 2003 : Didier Clément et Philippe Petithuguenin, voir §5.1 et rapports de mission correspondants.

### **5.4.2. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas-BA**

Depuis mon arrivée, je suis en contact avec Claudia Forte Ferreira, chercheur à l'Embrapa Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas-BA) qui a effectué un post-doctorat pour moitié au CEPEC et pour moitié à l'UESC sur l'étude de l'interaction cacao-*Crinipellis*. Claudia a participé aux toutes premières expériences d'extraction d'ARN de cacaoyer (voir § 7.1.).

### **5.4.3. Unicamp, Campinas-SP**

Mes contacts à Unicamp, obtenus par l'intermédiaire de Júlio Cascardo, sont :

- Gonçalo Guimaraes Pereira, biologiste moléculaire, (Laboratoire de « Genômica e Expressão ») pour la partie microarrays et SAGE (voir § 8.1.). Gonçalo est également le directeur de thèse de Acassia Leal Pires ;
- Anderson Ferreira da Cunha, doctorant, (Laboratoire de « Genômica e Expressão ») pour la partie SAGE ;
- Michel Vincentz, biologiste moléculaire, pour la partie culture d'*Arabidopsis*. Michel est également le directeur de thèse de Fatima Alvim.

### **5.4.4. CEPLAC Belem**

J'ai eu l'occasion de rencontrer Jay Wallace, du CEPLAC Belem, lors d'une visite qu'il effectuait à la CEPLAC Bahia. Jay semble bien disposé pour développer des travaux en collaboration avec Júlio Cascardo mais également avec le Cirad.

## **6. Montage de projets et recherche d'appuis financiers**

Comme je l'ai décrit dans mon précédent rapport, le laboratoire de «Genômica e Expressão Gênica » dispose de financements pour la construction des banques d'ADNc, le

séquençage d'ESTs ainsi que pour l'analyse fonctionnelle de gènes d'intérêt (projets FAPESB obtenus par Júlio Cascardo et Abelmon Gesteira). Toutefois, en vue des futures expériences qui découleront de l'obtention des banques d'ADNc et du séquençage des ESTs correspondantes, le laboratoire (UESC-Cirad) a répondu à différents appels d'offre proposés par les institutions suivantes :

#### **6.1. FAPESB (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia)**

Un projet portant sur l'« Etude globale de l'expression des gènes de l'interaction cacao-*Crinipellis* par microarrays » a été proposé au premier semestre 2004. Coordinateur : Fabienne Micheli. Appui financier demandé : 78 468 réais.

Ce projet a été rejeté suite à la modification arbitraire des règles d'acceptation des dossiers après que ceux-ci aient été déposés auprès de la commission de sélection (raison invoquée : le coordinateur n'est pas un membre titulaire de l'institution sollicitante). En raison de la procédure illégale mise en œuvre par la FAPESB, et touchant de nombreux chercheurs et enseignants-chercheurs de l'état de Bahia, ces derniers ont protesté et ont obtenu la démission de l'ancienne directrice Cleilza Ferreira Andrade au profit, dans un premier temps, de Rafael Esmeraldo Lucchesi Ramacciotti, Secrétaire des Sciences, de la Technologie et de l'Innovation (voir Annexe 2), qui de part son cumul de fonctions a ensuite nommé Alexandre Tocchetto Pauperio à la tête de la FAPESB. Suite à ces événements, la FAPESB est actuellement en restructuration et les prochains appels d'offre devraient avoir lieu début 2004.

#### **6.2. CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico)**

Un projet portant sur l'« Etude de l'interaction cacao-*Crinipellis* par la méthode SAGE » a été proposé au premier semestre 2004. Coordinateur : Júlio Cascardo. Appui financier demandé : 50 000 réais. Ce projet, bien qu'ayant été très bien évalué scientifiquement par les deux rapporteurs n'a pas été retenu parmi les 30 projets finaux.

#### **6.3. IFS (International Foundation for Science)**

Un projet portant sur l'« Etude globale de l'expression des gènes de l'interaction cacao-*Crinipellis* par macroarrays » va être proposé en décembre 2004. Coordinateur : Júlio Cascardo. Appui financier demandé : 12 000 USD pour un an renouvelable 2 fois.

### **7. Valorisation des travaux effectués**

#### **7.1. Publications**

Un article concernant la nouvelle méthode d'extraction d'ARN mise au point à l'UESC (voir § 3.3.1.) a été publié dans une revue internationale à comité de lecture (facteur d'impact 2,173) : Abelmon Gesteira, Fabienne Micheli, Claudia Forte Ferreira and Júlio Cascardo (2003) Isolation and purification of functional total RNA from different organs of cocoa tree during its interaction with the pathogen *Crinipellis perniciososa*. Biotechniques, 35: 494-500. Partenaires participants : UESC, FAPESB, Cirad, EMBRAPA.

Deux autres articles sont en cours d'écriture : un concernant l'analyse d'un gène de nécrose (travail en collaboration avec Gonçalo Pereira, Unicamp), l'autre concernant l'analyse des ESTs des interactions résistante et sensible cacao-*Crinipellis* (voir § 3.3.2.).



## **7.2. Participations à des congrès**

### **7.2.1. 7<sup>th</sup> International Congress of Plant Molecular Biology**

Du 23 au 28 juin 2003, j'ai participé au « 7<sup>th</sup> International Congress of Plant Molecular Biology » à Barcelone, Espagne (<http://www.ispmb2003.com/>). Ce congrès était constitué de 8 sessions plénières, de 31 sessions concurrentes et de 4 sessions de présentation de posters. Différents workshops (e.g. "Genome maintenance and stability", "Rice advances in rice genome analysis and functional genomics") ainsi qu'un symposium spécial consacré aux "Applications of biotechnology in developing countries" étaient également inclus dans le programme. J'ai suivi les sessions concurrentes suivantes: "Genome analysis and organization", "Molecular breeding", "Molecular evolution and comparative genomics", "Signaling mechanisms in plant pathogen interaction", "Symbiotic interactions".

A l'occasion de ce congrès, j'ai présenté un poster résultat de la collaboration entre le Cirad-Cp Programme cacao, l'UESC et la CEPLAC: « Exploring the plant-pathogen interaction *Theobroma cacao-Crinipellis pernicioso* using EST analysis » par Abelmon Gesteira, Fabienne Micheli, Karina Gramacho, Jose Luis Pires and Júlio Cascardo.

### **7.2.2. 14<sup>th</sup> International Cocoa Research Conference**

Lors de la « 14<sup>th</sup> International Cocoa Research Conference » ayant eu lieu en octobre 2003 à Accra, Ghana (<http://www.copal-cpa.org/conference.html>), Júlio Cascardo a présenté la communication suivante: « Exploring the plant-pathogen interaction *Theobroma cacao-Crinipellis pernicioso* using random sequencing and SAGE analysis. » par Abelmon Gesteira, Fabienne Micheli, Karina Gramacho, Jose Luis Pires and Júlio Cascardo.

### **7.2.3. I encontro baiano de biotecnologia e desenvolvimento**

La « I encontro baiano de biotecnologia e desenvolvimento » fait suite à la construction de l'IBB (Instituto Baiano de Biotecnologia) constitué par les différentes institutions publiques de recherche de l'état de Bahia (construction approuvée et financée par la FINEP). Le programme de cet événement consistait d'une part à présenter les différents partenaires de l'IBB (Apresentações institucionais), d'autre part à mettre en relation ces partenaires avec des entreprises privées de biotechnologies (Apresentações empresariais). Des conférences générales portant sur les biotechnologies, la propriété intellectuelle ou encore les organismes transgéniques ont également été présentées (Conferências). A l'occasion de cette rencontre, l'UESC et la CEPLAC, partenaires du Cirad pour la recherche cacaoyère ont présenté leurs travaux en rapport avec les biotechnologies ainsi que leur contribution au sein de l'IBB.

## **7.3. Participation au Comité Technico-scientifique du 2<sup>o</sup> Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas**

J'ai été contactée par Claudia Ferreira pour participer, comme Consultant, au Comité Technico - scientifique du « 2<sup>o</sup> Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas » ayant eu lieu à Porto Seguro-BA, Brésil (<http://www.sbmp.org.br/2cbmp/>). Ma contribution a consisté en la sélection de présentations



(posters et communications) dans les domaines de la biologie moléculaire et de l'amélioration des plantes.

## **8. Conclusions et Perspectives**

### **8.1. Travaux expérimentaux en cours et en prévision**

Les perspectives pour l'année 2004 consistent en l'obtention de l'ensemble des 10 000 ESTs prévues, en leur analyse par bioinformatique ainsi qu'en la sélection, sur la base d'homologies de séquences, de quelques gènes d'intérêt qui pourront être étudiés individuellement et qui pourront éventuellement donner lieu à des sujets de stage, de mestrado ou de thèse.

Après analyse par bioinformatique et élimination des ADNc redondants, les séquences composant les deux banques d'ADNc pourront être utilisées pour une analyse d'expression à grande échelle sur arrays. Selon les possibilités de collaborations (Unicamp, Pennstate, Cirad-AMIS) et les financements obtenus, seront développés des micro- (sur lame de verre / hybridation avec des sondes fluorescentes) ou des macroarrays (sur membrane de Nylon / hybridation avec des sondes radioactives) [10-12]. L'expression des gènes pourra être étudiée au cours de différentes phases de la maladie mais également lors de l'induction des défenses de la plante par des molécules chimiques (e.g. acide salicylique).

D'autre part, une étude quantitative des gènes exprimés lors des interactions TSH118-*Crinipellis* et Catongo-*Crinipellis* sera entreprise via la méthode SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) [13-17].

Dans le cadre du projet « ESTs-Hévéa », et en fonction de l'avancée des décisions concernant l'affectation de Dominique Garcia à l'UESC, quelques tests concernant, dans un premier temps, les extractions d'ARNs de l'interaction hévéa-*Microcyclus* pourront être effectuées (sujet de stage pour un étudiant de second cycle).

### **8.2. Demandes d'appuis financiers**

Pour la partie arrays, sera proposé un projet à IFS d'ici la fin de l'année 2003. Un projet « ESTs hévéa » (voir § 5.2.) ainsi qu'un projet « cytologie » (voir § 5.3.) pourront être présentés à la FAPESB ou au CNPq dès l'ouverture des appels d'offre (début 2004).

### **8.3. Publications**

Pour l'année 2004, trois articles sont prévus pour publication dans des journaux internationaux à comité de lecture (voir § 7.1.): analyse d'un gène de nécrose (en collaboration avec Unicamp); analyse des ESTs de l'interaction cacao-*Crinipellis*; étude cytologique de l'interaction cacao-*Crinipellis*.

### **8.4. Collaborations**

Il semble que les collaborations, à la fois, entre l'UESC et la CEPLAC, et le Cirad et la CEPLAC offrent d'excellentes perspectives. La probable affectation de Didier Clément au CEPEC en septembre 2004 devrait consolider les relations déjà établies entre ces trois institutions, et devrait également permettre une meilleure complémentarité thématique

(biologie moléculaire fonctionnelle et structurale, breeding) avec comme objectif (à moyen terme) d'obtenir par SAM (Sélection Assistée par Marqueurs) des variétés de cacaoyers résistantes à *Crinipellis*.

De plus, la possible arrivée en 2004 de Dominique Garcia sur un projet d'analyse de l'interaction hévéa-*Microcyclus* par génomique fonctionnelle, permettrait de renforcer l'étude générale des interactions plantes perennes-pathogènes telle qu'elle est actuellement définie dans la proposition de fonctionnement de l'UPR « Ressources génétiques et génomiques pour la résistance durable aux bioagresseurs chez les plantes pérennes » (à laquelle Didier Clément, Dominique Garcia et moi-même serions rattachés).

D'autre part, au cours de l'année 2004, et en fonction des objectifs du Programme Cacao, il pourra être envisagé de développer de plus fortes collaborations avec les chercheurs d'Almirante Cacao.

## 9. Bibliographie

- [1] **Schneiderbauer A., Sandermann Jr H., and Ernst D.** (1991) Isolation of functional RNA from plant tissues rich in phenolic compounds. *Anal. Biochem.* 197:91-95.
- [2] **Schultz D.J. Craig R., Cox-Foster D.L., Mumma R.O., and Medford J.I.** (1994) RNA isolation from recalcitrant plant tissue. *Plant Mol. Biol. Rep.* 12:310-316.
- [3] **Burgos R.C. Chiang V.L., Zhang X.H., Campbell E.R., Podila G.K., and Campbell W.H.** (1995) RNA isolation from plant tissues recalcitrant to extraction in guanidine. *BioTechniques* 19:734-737.
- [4] **Chi-Manzanero B., Robert M.L., and Rivera-Madrid R.** (2000) Extraction of total RNA from a high pigment content plant Marigold (*Tagetes erecta*). *Mol. Biotechnol.* 16:17-21.
- [5] **Suzuki Y., Makino A., and Mae T.** (2001) An efficient method for extraction of RNA from rice leaves at different ages using benzyl chloride. *J. Exp. Bot.* 52:1575-1579.
- [6] **Wang S.X., Hunter W., and Plant H.** (2000) Isolation and purification of functional total RNA from woody branches and needles of Sitka and White Spruce. *BioTechniques* 28:292-296.
- [7] **Kochhar S., Gartenmann K., Guilloteau M., and McCarthy J.** (2001) Isolation and characterization of 2S cocoa seed albumin storage polypeptide and the corresponding cDNA. *J. Agric. Food Chem.* 49:4470-4477.
- [8] **Jones P.G., Allaway D., Gilmour D.M., Harris C., Rankin D., Retzel E.R., and Jones C.A.** (2002) Gene discovery and microarray analysis of cacao (*Theobroma cacao* L.) varieties. *Planta* 216:255-264.
- [9] **Laloi M., McCarthy J., Morandi O., Gysler C., and Bucheli P.** (2002) Molecular and biochemical characterisation of two aspartic proteinases TcAP1 and TcAP2 from *Theobroma cacao* seeds. *Planta* 215:754-762.
- [10] **Reymond P.** (2001) DNA microarrays and plant defense. *Plant Physiol. Biochem.* 39: 313-321.
- [11] **Shenk PM, Kazan K., Wilson I., Anderson J.P., Richmond T., Somerville S.C. and Manners J.M.** (2000) Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *PNAS*, 97: 11655-11660.
- [12] **Cheong Y.H., Chang H.-S., Gupta R., Wang X., Zhu T. and Luan S.** (2002) Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 129: 661-677.

- [13] **Velculescu, V.E., Zhang, L., Vogelstein, B. and Kinzler, K.W.** (1995) Serial Analysis of Gene Expression. *Science*, 270: 484-487.
- [14] **Kenzelmann, M. and Mühlemann, K.** (1999) Substantially enhanced cloning efficiency of SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) by adding a heating step to the original protocol. *Nucl. Acids Res.*, 27: 917-918.
- [15] **Powell, J.** (1998) Enhanced concatemer cloning – a modification to the SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) technique. *Nucl. Acids Res.*, 26: 3445-3446.
- [16] **Margulies, E.H. and Innis, J.W.** (2000) eSage: managing and analysing data generated with Serial Analysis of Gene Expression (SAGE). *Bioinformatics*, 16: 650-651.
- [17] **Lash, A.E., Tolstoshev, C.M., Wagner, L., Schuler, G.D., Strausberg, R.L., Riggins, G. and Altschul, F.** (2000) SAGEmap: a public gene expression resource. *Genome Research*, 10: 1051-1060.



## **A N N E X E 2**

### **CONTRAT DE COLLABORATION**

# **CONTRACT FOR SCIENTIFIC COLLABORATION**

**in the field of cocoa breeding ....**

**Between:**

The CEPLAC/CEPEC– km ... – Rodovia Ilhéus /Itabuna – Brazil, represented by Dr Uilson Lopez, Director, hereinafter referred to as "CEPEC",

of the first part,

**and:**

The Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, a State-owned industrial and commercial establishment, 42 rue Scheffer 75116 PARIS - FRANCE, represented by Mr Dominique BERRY, Director of the Tree Crops Department, hereinafter referred to as "CIRAD-CP",

of the second part,

**GIVEN:**

- The Cooperation Agreement signed between the governments of France and Brazil on.....
- The mutual desire of both CEPEC and CIRAD-CP to strengthen their collaboration to the benefit of stakeholders in the cocoa commodity chain, in order for it to contribute as effectively as possible to the economic development of the country.
- The skills existing within CEPEC and CIRAD in the field of scientific research, notably in the genetic improvement of cocoa for disease resistance.....

**IT HAS HEREBY BEEN DECIDED AND AGREED AS FOLLOWS:**

## **ARTICLE I - SCOPE AND FIELDS OF COLLABORATION**

CEPEC and CIRAD-CP are setting up a scientific collaboration programme focusing on studies and research in.....

The purpose of this cooperation agreement is to define and specify the content, objectives and practical arrangements for the implementation of this collaboration programme.

## **ARTICLE II - CONTENT OF OPERATIONS AND TYPES OF COLLABORATION**

The programme of activities covered by this agreement is detailed in the annex to this agreement, of which it forms an integral part.

The various arrangements that will be adopted with a view to implementing the agreements covered by this contract will be those that the parties judge most appropriate for the objectives sought, bringing into play the following cooperation arrangements:

- Assignment of a CIRAD-CP researcher to CEPEC
- Occasional technical missions by researchers between the two organizations
- Provision of scientific and technical equipment
- Planting material exchanges ????
- Training through courses, seminars and refresher courses, study trips and grants
- Reciprocal information and scientific exchanges in the form of books, journals, bulletins and other means of communication.

## **ARTICLE III - EXPECTED RESULTS**

The main results expected from this cooperation are as follows:

- Acquire a good knowledge of....., so as to create new varieties obtained through a Marker-Assisted Selection (MAS) strategy.
- Create a centre of knowledge on the genetic bases of resistance to cocoa diseases, through collaboration between CEPEC and CIRAD, but also by associating with other scientific establishments.

## **ARTICLE IV - COMMITMENT AND CONTRIBUTION OF THE PARTIES**

CIRAD-CP and CEPEC will exchange non-confidential scientific and technical information arising from their respective activities, in the form of publications, dissertations, documents and reports. The parties agree to the following provisions for implementation of the research programme:



## 1/ For CIRAD :

- a. Assign a breeder specialized in molecular markers.... The researcher will be based at Ilhéus, Brazil, for a period of 2 or 3 ?? years. He will work in the CEPEC molecular biology laboratory on the basis of a minimum of 9 months' presence per year to carry out the operations detailed in the annex. The CIRAD-CP researcher will work in close collaboration with the CIRAD Cocoa Programme and with the CEPEC molecular biology laboratory. He will work with and receive scientific support from other CIRAD researchers, French or non-French research centres, notably for .....aspects associated with the plant.
- b. Cover the salary, employer's wage costs, and health and social charges for the researcher.
- c. Cover travel costs between France and Brazil (assignment and leave), and accommodation costs in Ilhéus for the researcher.
- d. Participate in and provide assistance to CEPEC in any search for additional funding specific to the fields of activity covered by the project.

## 2/ For CEPEC:

- a. Complete the necessary formalities for the CIRAD researcher to benefit from the status of "visiting scientist" at CEPEC, along with the privileges, prerogatives and obligations set down in the regulation relative to this type of personnel, notably in terms of a residence permit and visa.
- b. Cover operating costs for the local activities of the CIRAD researcher assigned to Brazil, and notably provide him with all the necessary office and laboratory facilities, logistics support, transport for trial visits, scientific equipment, technical manpower and all operating facilities for the effective completion of his research activities.
- c. Take steps to obtain, within 2 years, specific funding , in Brazil or internationally, to cover the costs of accommodation and transport for the CIRAD researcher, and part of his salary benefits costs.
- d. If necessary, obtain additional specific funding, either in Brazil or internationally, to ensure smooth running of the research work.
- e. Authorize the CIRAD-CP researcher to carry out study missions, technical assistance missions and/or appraisals on behalf of CIRAD, for a maximum of one month per year. In addition, the researcher may undertake such missions under joint CIRAD-CEPEC contracts.
- f. Authorize trainees and students to come to CEPEC and be supervised by the CIRAD-CP researcher to work in the research fields covered by this contract, in accordance with arrangements to be defined beforehand by mutual agreement.

## **ARTICLE V - PROVISIONS RELATIVE TO STAFF**

The CIRAD-CP researcher assigned to CEPEC will continue to be answerable to the Head of the CIRAD-CP Cocoa Programme. However, for his activities at CEPEC, he will work in close consultation with the Head of the CEPEC Molecular Biology Laboratory ?? or Director ?, to whom he will report on his activities.

The internal regulations, hygiene and safety rules specific to each organization will be brought individually to the knowledge of visiting researchers, immediately on their arrival.

Each party to the contract acknowledges having taken out insurance covering civil liability in connection with the performance of this agreement.

CIRAD-CP and CEPEC accept all consequences of their third-party liability in respect of third parties and their entitled parties, under common law relative to any physical or material damage caused to third parties by their personnel or equipment, or by any personnel or equipment placed under their responsibility or care.

In the event of an accident involving the visiting agent, the host organization shall inform the other party as soon as possible.

In terms of their individual, administrative, scientific and technical situation, the personnel will remain subject to the general or specific by-laws governing their organization of origin.

## **ARTICLE VI - PROGRAMMING AND MONITORING OF ACTIVITIES**

The programming of project activities will be coordinated between the CEPEC and CIRAD researchers involved.

Every year or every 2 years ?, the project will be subject to a technical appraisal by a monitoring committee comprising respectively:

- For CIRAD-CP: the Head of the Cocoa Programme and/or the Scientific Director, or mandated person.
- For CEPEC: the ----- and/or the Scientific Director.

Other outside persons may be associated with the committee, by mutual agreement.

These exchanges will take the form of meetings or any other form of communication. Each year, a report will be drafted and co-signed by both parties ?? or just exchanged between both parties ?, specifying the achievements of the past year, along with the programmes and specific resources required to implement them in the coming year.

## **ARTICLE VII - INTELLECTUAL OWNERSHIP**

Each of the parties will remain the owner of its achievements and contributions existing prior to signature of the contract.

CEPEC and CIRAD-CP shall be considered co-owners of any scientific and technical results obtained under activities developed through the performance of this agreement.

In general, studies and work carried out under this agreement may be subject to the registration of patents, or to national or international certification. Such registrations or certifications shall be subject to prior negotiations between the two parties concerning names and costs relative to the registration.

The parties will decide by mutual agreement on the commercial development of any future results that might lend themselves to such development. Distribution of the benefits from such commercial development between the parties will be determined by mutual agreement between the two organizations, taking into account the intellectual and financial contribution of each party. These arrangements will be specified in separate contracts.

## **ARTICLE VIII - CONFIDENTIALITY**

The parties hereby agree not to publish or divulge in any way, without the written agreement of the other party, any scientific or technical information which might have come to its knowledge from the other party during the performance of this agreement, for so long as the said information has not been protected and without having received the authorization of the party providing the said information. This provision is null and void if the party involved can provide proof that:

- it already had knowledge of the said information before the date of signature of this agreement,
- it acquired the knowledge licitly from a third party,
- this information has appeared in a publication or conference paper,
- or the information has come into the public domain.

Consequently:

- 1) visiting students must sign a confidentiality commitment,
- 2) each researcher, technician and trainee covered by this agreement must draw up a standardized and numbered research logbook, signed at the end of each month by a person from outside the team.

It is agreed that the provisions of this article shall in no way prevent the researchers of public establishments from fulfilling their obligations to draw up a periodic progress report or, in the event of information of a highly confidential nature, a confidential report for the governing body of the parties, insofar as such a report does not constitute disclosure under industrial ownership laws.



This collaboration between CEPEC and CIRAD-CP does not constitute exclusivity in the field of collaboration stated in article 1. Each partner is therefore free to contact third parties, be they public or private, to establish scientific or technical cooperation. However, clear mention shall be made of this collaboration and each party shall inform the other of any contacts established.

## **ARTICLE IX - PUBLICATIONS AND TRANSMISSION OF INFORMATION**

Any publication or transmission of information to third parties relative to activities undertaken under this agreement will mention the collaboration of the two parties. It will be subject to mutual agreement, but shall not prevent either the registration of patents, or commercial exploitation. To that end, the parties hereby agree to keep secret any information likely to result in the registration of a patent or of plant breeder's rights, up to the moment the application has been registered. The parties also hereby agree to maintain the confidentiality of any exploitable know-how.

## **ARTICLE X - VALIDITY AND DURATION OF THE CONTRACT**

This general agreement will come into force on the date of signature and will be concluded for a period of two or three years ? It may be renewed by rider.

## **ARTICLE XI - TERMINATION**

This agreement may be terminated, subject to six months' notice by registered letter with recorded delivery from the party wishing to terminate.

It will be terminated, by right, by either party in the event of the failure of the other party to perform one or more of the obligations set down in the different clauses. Such annulment shall only become effective three months after the sending of a registered letter with recorded delivery by the complainant setting out the reasons for the complaint, unless, within that period, the defaulting party fulfils its obligations or provides proof of prevention resulting from a case of force majeure. Use of this possibility to terminate does not relieve the defaulting party from fulfilling its contractual obligations up to the date termination becomes effective, also being subject to any damages incurred by the complainant due to the early termination of the contract.

Termination or annulment of this agreement shall not affect the provisions set down in articles IX, X and XI above.

## **ARTICLE XII - LITIGATION**

In the event of difficulties in the interpretation or performance of this agreement, the parties hereby agree to seek an amicable settlement to the dispute. Should the dispute persist, it shall be submitted to a court of arbitration, for which each party shall designate an arbitrator. The two arbitrators will designate a third arbitrator to be the President of the court of arbitration.

Ilhéus/Itabuna, on 2001

Montpellier, on 2001

for CEPEC

for CIRAD-CP

Uilson LOPEZ  
Director

Dominique BERRY  
Director

## ANNEX

### CEPEC-CIRAD collaborative scientific programme for cocoa

#### 1. Activities

The activities carried out are in the area of genome expression studies on *Theobroma cacao*. One of the first studies to be carried out relates to gene expression of cocoa tissue challenged with *Crinipellis perniciosa* spores. EST's will be sequenced from libraries generated from plants inoculated or not with *Crinipellis perniciosa* spores and microarray studies carried out to assess differential gene expression. C-DNA libraries will be cloned directionally in expression vectors that can be induced to produce proteins.

Details of the activities to be carried out in collaboration between CIRAD-CP and CEPEC will be defined in a general joint work plan for three years, to be elaborated within two months from the arrival at CEPEC of the CIRAD scientist.

#### 2. Human resources

The research work will be carried out in Brazil by the CEPEC molecular biology team, in close liaison with the CIRAD-CP genomic researcher. The research may receive support or collaborations from other institutions, such as UNICAMP in Campinas, Brazil.

Dr. Julio Cascardo of CEPEC, a specialist in molecular biology and genomic studies, is the coordinator of the *Crinipellis* and cocoa genomic studies at CEPEC.

The CIRAD scientist, a specialist in molecular physiology, will collaborate in the joint CEPEC/CIRAD-CP research programme, as defined above, for an initial period of 3 years.

#### 3. Laboratories, infrastructure and equipment

For the identified research objectives, CEPEC has a 96 capillary sequencer available as well as the necessary infrastructure for working on molecular biology and cocoa genomics. CEPEC may use its collaborative links with UNICAMP for any microarray studies required.

CIRAD is actively working on cocoa molecular biology, especially in its laboratory for Tropical Crop Genome Research (BIOTROP) in Montpellier, France. CIRAD has extensive expertise in analyses of genetic diversity and QTL mapping of interesting traits in cocoa. The experience of the BIOTROP laboratory will provide support for the joint CEPEC/CIRAD-CP research programme.

CEPEC is participating in a joint genome sequencing project, together with other universities and research centres in Brazil (UNICAMP). The expertise obtained will be of use in the joint CEPEC/CIRAD-CP research programme.



Both CIRAD-CP and CEPEC may agree in the future to collaborate in a wider framework on cocoa genomic studies, in any type of consortium, if such is to be established within the next few years. The presently identified studies may then be modified according to the new collaborative working structure.

#### **4. Reporting**

Progress and other types of reporting by the researchers will be according to the normal procedures of each of the institutes involved (CIRAD-CP and CEPEC). The collaborative nature of the research will be identified in any type of external reporting or publication of results from the joint CIRAD-CP/CEPEC research.

#### **5. Results expected in the short and medium terms:**

The first phase of the work will provide EST sequences related to genes expressed in young cocoa tissue challenged with *Crinipellis* spores.

The results expected in the medium term are the utilization of candidate genes for mapping, to facilitate introgression strategies and to create new varieties resistant to *Crinipellis perniciosa*. The medium term results may also be related to research on gene expression of cocoa challenged with other pathogens, such as *Phytophthora* *ssp.*